

## Ocena skuteczności fungicydów

### Zaprawy nasienne przeciw chorobom siewek (próby w warunkach kontrolowanych)

#### Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób przeprowadzania badań nad skutecznością zapraw nasiennych przeciw chorobom siewek (w warunkach kontrolowanych).

Niniejsza norma dotyczy oceny grzybobójczych zapraw nasiennych w zwalczaniu chorób siewek. Jest przeznaczona głównie do upraw na polach o bardziej zagęszczonym siewie lub upraw warzyw i chorób związanych z gniciem roślin spowodowanym zagrzybieniem gleby. Ze względu na trudności wynikające z przeprowadzania testów w warunkach polowych, próby wykonuje się w warunkach kontrolowanych. Szczegółowe informacje podane są dla trzech rodzajów upraw: buraków cukrowych, kukurydzy i warzyw strączkowych, jednak podstawowa zasada metody może być zastosowana także przy innych uprawach. Mimo że metoda jest przede wszystkim przeznaczona do chorób przenoszonych przez glebę, to może być także stosowana do niektórych chorób przenoszonych przez nasiona (np. *Pleospora betae* buraka). Przenoszone przez nasiona choroby zbóż omówione są w Normie EPPO PP 1/19 Przenoszone przez nasiona choroby grzybicze roślin zbożowych [Seed-borne cereal fungi], a grzybicze choroby roślin ozdobnych – w Normie EPPO PP 1/40 Grzyby glebowe atakujące rośliny ozdobne [Soil fungi attacking ornamental plants]. Zabiegi doglebowe przeciw *Pythium* spp. omówione są w Normie EPPO PP 1/48 Zabiegi doglebowe przeciw *Pythium* spp. [Soil treatments against *Pythium* spp.]

#### Zatwierdzenie normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzona w latach 1987-09.

Zmieniona wersja normy z 1996r.

Zatwierdzenie normy i poprawki latach 1999-09.

#### 1. Warunki doświadczenia

##### 1.1 Organizmy badane, wybór upraw i jej odmiany

Organizmy badane: patogeny powodujące gnicie np. *Pythium* spp. (PYTHSP), *Aphanomyces cochlioides* (APHACO), *Pleospora betae* (PLEOBJ) i *Gibberella fujikuroi* (anamorfa *Fusarium moniliforme*) (GIBBFU).

Rośliny uprawne: W przypadku buraka cukrowego *Beta vulgaris* (BEAVX) (jakakolwiek podatna odmiana), nasiona poddane zabiegowi powinny być uzyskane od dostawcy, albo w celu normalnego sadzenia, albo precyzyjnego sadzenia w rzędach (genetyczne nasiona jednokielkowe) lub otoczkowane otoczkowane. W przypadku kukurydzy *Zea mays* (ZEAMX), groszku *Pisum sativum* (PIBST), fasoli *Phaseolus vulgaris* (PHSVX), rzepaku *Brassica napus* (BRSNN), słonecznika *Helianthus annuus* (HELAN), szpinaku *Spinacia oleracea* (SPQOL) lub innych upraw, należy użyć kwalifikowanego materiału siewnego jakiegokolwiek podatnej odmiany. Znany powinien być procentowy poziom kiełkowania danych nasion.

Doświadczenie należy przeprowadzić na roślinach uprawnych oraz organizmach badanych przeznaczonych do tego celu.

##### 1.2 Warunki doświadczenia

Doświadczenie należy przeprowadzić w warunkach kontrolowanych (szklarnia, komora chłodnicza, komora wzrostu roślin), w temperaturze zbliżonej do minimalnej tolerowanej przez badane rośliny. Temperatury te są zazwyczaj utrzymywane przez 10-14 dni po zasianiu. Używa się zazwyczaj sztucznie inokulowanego substratu (patrz: Załącznik I). Można też użyć naturalnie porażonego czarnoziemiu zebranego z górnej warstwy (do 20 cm) pola, gdzie wcześniej uprawiano dane rośliny. Przed rozpoczęciem doświadczenia należy przebadać glebę w celu zidentyfikowania obecnego patogenu siewek lub stwierdzić przyczynę obumarcia badanych roślin, na

przykład przez rozsiewanie porażonego materiału (patrz: 3.2.1).

Doświadczenie przeprowadza się na tacy na nasiona lub w podobnym pojemniku, który pomieści przynajmniej 50 (najlepiej 100) nasion lub granulek, w odległości co najmniej 3 cm, w glebie o głębokości co najmniej 6 cm (np. tace na nasiona w rozmiarze 28x45 cm). Pojemnik należy najpierw napęlnić lekko ubitą, wygładzoną glebą na głębokość 3 cm. Następnie posadzić nasiona i przykryć następną warstwą o grubości 3 cm. Innym rozwiązaniem jest napęlnienie pojemnika na głębokość 6cm i zrobienie sadzakiem ogrodniczym dziur o głębokości 3 cm, w odpowiednich odstępach. Nasiona umieszcza się kleszczami a następnie delikatnie przykrywa dziury. Należy utrzymywać średnie nawilżenie gleby przez cały czas trwania próby.

Doświadczenie powinno być częścią serii badań (zob. Normy EPPO PP 1/181 Przeprowadzanie i raporty z badań nad oceną skuteczności

[Conduct and reporting of Efficacy Evaluation Trials]).

### 1.3 Projekt i układ doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami), preparatem porównawczym i poletko kontrolne, powinny być rozmieszczone według odpowiedniego układu statystycznego.

Rozmiar poletka (bez pasów ochronnych): jeden pojemnik a nasionami (co najmniej 50 nasion)

Liczba powtórzeń: co najmniej 4, zazwyczaj powinno się zasadzić co najmniej 200 nasion podczas jednego zabiegu.

W celu uzyskania dalszych informacji odnośnie projektu badań, zob. Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza badań oceniających skuteczność

[Design and Analysis of Efficacy Evaluation Trials].

## 2. Stosowanie zabiegów

### 2.1 Badany preparat (preparaty)

Oceniany preparat (preparaty) powinien być konkretnym fungicydem o określonej formulacji (zob. Normy EPPO PP 1/181 Przeprowadzanie i raporty z badań nad oceną skuteczności).

### 2.2. Preparat porównawczy

Preparat porównawczy powinien być środkiem znanym z praktycznej skuteczności w warunkach uprawy i zdrowotności roślin oraz w warunkach środowiskowych (włącznie z klimatycznymi) na obszarze, na którym ma być prowadzone doświadczenie. W zasadzie mechanizm działania, terminy i metody stosowania powinny być jak najbardziej zbliżone do tych dla badanego środka.

## 2.3 Sposób stosowania

### 2.3.1 Sposób wykonania zabiegu

Sposób wykonania zabiegu powinien odpowiadać zalecanemu dla danego fungicydu.

Zabiegi na nasionach są zazwyczaj stosowane z użyciem sprzętu laboratoryjnego (patrz 2.3.2), jednak nasion poddanych zabiegowi (razem z kontrolną partią nasion niepoddanych zabiegowi) może dostarczyć dostawca, zwłaszcza w przypadku nasion granulowanych. Jeśli dostarczone są nasiona poddane zabiegowi, to należy podać należyte informacje nt. źródła nasion i rodzaju zabiegu.

### 2.3.2 Rodzaj sprzętu

Zabiegi powinny być wykonane przy użyciu sprzętu pozwalającego na równomierne rozmieszczenie preparatu, zgodnego z dobrą praktyką produkcyjną. Zabiegi te to:

- zabieg suchy – nasiona są mieszane z preparatem w specjalnie do tego przeznaczonym bębnie przez przynajmniej 5 min,
- zabieg mokry - ilość płynu potrzebna do nasion użytych w zabiegu dzielona jest na trzy części. Następujące czynności wykonywane są po trzy razy: równomiernie spryskuje się ściany bębna jedną częścią płynu, dodaje się wszystkie nasiona i potrząsa aż prawie cały płyn zniknie ze szklanej ścianki, a następnie wyjmuje się nasiona,
- zabieg rozrzedzony – odpowiednią ilość koncentratu wlewa się na górną krawędź ściętego bębna, dodaje się za pomocą pipety odpowiednią ilość wody. Po odczekaniu, aż produkt uformuje zawiesinę, należy obrócić bęben tak, aby równomiernie rozprowadzić preparat na szklanej ściance. Dodaje się nasiona i wstrząsa, aż preparat zostanie usunięty ze ścianki.

### 2.3.3 Terminy i częstotliwość stosowania

Liczba zabiegów oraz data każdego z nich powinny być dostosowane do zaleceń ochrony.

Zazwyczaj dokonuje się jednego zabiegu bezpośrednio przed wysiewem.

### 2.3.4 Dawki i objętości

Preparat powinien w zasadzie być stosowany w dawkach określonych w zaleceniach (zob. 2.3.2). Dawki wyższe lub niższe niż zalecane mogą być sprawdzone w celu określenia zakresu skuteczności i bezpieczeństwa uprawy.

Stosowane dawki powinny być wyrażone w kg (lub L) określonego produktu na kg lub jednostkę nasion. Przydatne może być również odnotowanie dawek w g aktywnej substancji na kg nasion. Należy odnotować wszelkie odstępstwa od zalecanego dawkowania.

### 2.3.5 Dane dotyczące innych środków ochrony roślin

Nie należy stosować innych środków chemicznych

### 3. Sposób zbierania i rejestrowania wyników oraz dokonywania pomiarów

#### 3.1 Dane meteorologiczne i edaficzne

##### 3.1.1 Dane meteorologiczne

Należy odnotować średnie temperatury w °C przez cały okres trwania próby (zob. 1.2).

##### 3.1.2 Dane edaficzne

Nie są wymagane.

#### 3.2 Sposób, terminy oraz częstotliwość dokonywania oceny

##### 3.2.1 Rodzaj danych

Przy pierwszej i drugiej ocenie należy policzyć wszystkie wschodzące rośliny w każdym pojemniku. Przy trzeciej ocenie należy policzyć wszystkie rośliny, których części naziemne wydają się zdrowe, w każdym pojemniku. W przypadku chorych roślin, należy zidentyfikować organizm, który wywołał chorobę (chyba, że substrat był poddany sztucznej inokulacji) przez wysianie porażonego materiału na odpowiednim podłożu odżywczym lub, w przypadku lęgniowców, przez umieszczenie w wysterylizowanej wodzie na 24-36 godzin.

##### 3.2.2 Terminy i częstotliwość

I ocena: kiedy wszędzie ponad połowa siewek w pojemnikach z preparatem porównawczym

II ocena: 2-3 tygodnie po pierwszej

III ocena: kiedy około 10% roślin w pojemnikach z preparatem porównawczym ma prawdziwe liście wielkości 1-2 cm (dla buraków cukrowych) lub 2-3 tygodnie później.

Przydatne mogą być oceny dodatkowe między powyższymi ocenami, zwłaszcza między pierwszą a drugą oceną.

#### 3.3 Bezpośredni wpływ na roślinę uprawną

Uprawa powinna być zbadana na obecność objawów fitotoksyczności zarówno na liściach, jak i na korzeniach, a wyniki tego badania powinny być zapisane. Ponadto należy opisać wszelkie objawy korzystnego działania preparatu. Wszelkie pozytywne

efekty, ich rodzaj oraz rozmiary widoczne w uprawie powinny być opisane, a nawet brak jakichkolwiek efektów powinien być odnotowany.

Fitotoksyczność powinna być szacowana następująco:

(1) Jeśli objawy fitotoksyczności są policzalne lub mierzalne, powinny być wyrażony w liczbach bezwzględnych.

(2) W pozostałych przypadkach częstotliwość i natężenie uszkodzeń powinny być oszacowane. Można to zrobić dwójako: każde poletko jest oceniane na obecność środków fitotoksycznych w odpowiedniej skali, bądź też każde traktowane poletko jest porównywane z poletkiem kontrolnym a fitotoksyczność jest wyrażana procentowo.

We wszystkich przypadkach objawy uszkodzenia roślin powinny być dokładnie opisane (skarłowacenia, chloroza, deformacje, itp.). W celu uzyskania dalszych szczegółów zob. Normę EPPO PP 1/135 Badanie fitotoksyczności, która zawiera rozdziały poświęcone poszczególnym uprawom.

[Phytotoxicity assessment which contains sections on individual crops].

#### 3.4 Wpływ na organizmy niebędące przedmiotem zwalczania

Nie dotyczy

#### 3.5 Jakościowe i ilościowe rejestrowanie plonów

Nie dotyczy

### 4. Wyniki

Wyniki powinny być przedstawione w formie usystematyzowanej a raport powinien obejmować analizę i ocenę. Dane źródłowe (robocze) również powinny być dostępne. Należy też dokonać analizy statystycznej przy użyciu odpowiednich metod, które powinny być podane. Brak takiej analizy powinien być uzasadniony. Zobacz Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza skuteczności badań szacunkowych [Design and Analysis of Efficacy Evaluation Trials].

MgSO<sub>4</sub>, 11.6 mg EDTA, 0.04 mg tiaminy, 20 g Difco agar, 50 mg of streptomycyny and 1000 mL wody sterylnej)

Inokulum jest przygotowywana w następujący sposób. Należy przygotować dokładną mieszaninę z 10 l piasku, 10 l kompostu, 5 l torfu i 250 g mąki owsianej, lekko zwilżyć, a następnie umieścić ją w kolbach Erlenmeyera. Kolby należy dwukrotnie poddać obróbce w autoklawie, przez dwa kolejne dni, w temperaturze 120°C przez godzinę. Dokonać inokulacji kolb *Pythium* sp. pochodzącym z czystej kultury, inkubowanym w temperaturze około 20°C przez 4-5

### Załącznik I

#### Przykłady metod sztucznej inokulacji buraka cukrowego

##### A. Inokulacja *Pythium*

Spp. *Pythium* takie jak *P. ultimum* (PYTHUL), *P. intermedium* (PYTHIN), *P. irregulare* (PYTHIR), *P. aphanidermatum* (PYTHAP), należy wyizolować z zaatakowanych siewek buraka cukrowego i utrzymywać na odpowiednim podłożu odżywczym, np. podłożu Schmidthennera (0,12 g asparaginy, 0,41 g sacharozy, 30 mg KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 30 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mg

tygodni, w tym czasie grzybnia skolonizuje całą zawartość kolby, a oospory najprawdopodobniej uformują się w dużej ilości. Inokulum należy następnie dokładnie wymieszać z 9 częściami sterylnego kompostu. Zależnie od celów badania, przydatne może być w tym momencie dodanie takich samych ilości rozrzedzonej szczepionki kilku różnych odmian *Pythium* sp.

Tace na nasiona należy częściowo napęlnić 4 częściami lekko ubitego kompostu, na tej warstwie umieścić nasiona następnie dodać do pełna 1,5 części rozrzedzonego inokulum.

#### B. Metoda inokulacji *Aphanomyces cochlioides*

*Aphanomyces cochlioides* wyodrębniony z porażonych siewek buraka cukrowego należy podtrzymywać na agarze Biomalz. Inokulum przygotowuje się przez wyhodowanie grzyba na bogatym w substancje odżywcze podłożu peptonowym (1 g bakteriologicznego peptonu, 1 g bakteriologicznego ekstraktu drożdżowego, 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , 2 g glukozy i 100 ml wody sterylnej) w temperaturze 20-22°C, co spowoduje swobodny rozwój grzybni. Kiedy szczepionka będzie potrzebna, grzybnię *A. cochlioides* należy opłukać 4 razy w wodzie sterylnej w celu usunięcia peptonu, potem, inkubować przez 24 godziny w temperaturze 20°C w sterylnej wodzie, tak aby uformowały się zarodnie i zarodniki. Bardzo ważna dla jakości i aktywności zarodników jest jakość użytej sterylnej wody. Woda destylowana lub zawierająca chlor nie nadaje się. Zazwyczaj odpowiednia jest nieskażona woda z potoku, deszczówka lub niegazowana woda mineralna.

Sterylnie donice (o przekątnej 14 cm) należy napęlnić około 300 ml mieszanki kompostu i piasku (1:1) i dwukrotnie poddać obróbce w autoklawie przez godzinę w temperaturze 120°C przez dwa kolejne dni. Z zasady, w każdej donicy sadi się 100 nasion (otoczkwanych lub nie) i pozwala im kiełkować w temperaturze 18-20 °C bez nadmiernego podlewania. Po 7-10 dniach, przerzedza się nasiona do 50 na donicę, umieszcza się donice na wypełnionych wodą tacach, aby zapewnić obieg wody (jedynie w takich warunkach można mieć pewność, że zarodniki pływają swobodnie w glebie i rażą na poziomie hypokotylu). Przez trzy kolejne dni podlewa się zawiesinę z zarodnikami 50 ml wody na donicę. Idealne warunki dla infekcji to temperatura 20°C i 60% wilgotność względna.

#### C. Metoda inokulacji *Pleospora betae*

*Pleospora betae* wyodrębniony z porażonych siewek buraka cukrowego należy podtrzymywać na odpowiednim podłożu odżywczym, np. PDA. Grzyby hodowane do inokulacji na podłożu na 9-cm płytkach Petriego przez 14 dni w temperaturze 20°C.

Zaraz przed szczepieniem kultura jest bardzo ostrożnie homogenizowana z najniższą możliwą prędkością blendera (konieczne jest uniknięcie zniszczenia komórek pyknidium i grzybni), tak aby uzyskać około 250 ml zawiesiny grzybniowej z 3-5 płytek Petriego.

Całość następnie dodaje się przez podlewanie do jednej tacy na nasiona (patrz poniżej).

Tacę napęlnia się najpierw 4 częściami kompostu po obróbce w autoklawie (dwukrotnie, przez dwa kolejne dni, w temperaturze 120°C przez godzinę), nasiona sadi się ostrożnie, tak aby zachować odpowiednie odstępy (można użyć ramy do zaznaczenia miejsc sadzenia), po podlaniu inokulum przykrywa się nasiona warstwą z 1,5 części kompostu po obróbce w autoklawie.